

Enriquecimiento proteico de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad con la asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomiun cellulolyticum* y *Candida utilis* para alimentación animal

Protein enrichment of the main agro-industrial lignocellulosic residues of the La Libertad Region with the joint association of *Trichoderma reesei*, *Chaetomiun cellulolyticum* and *Candida utilis* for animal feed

Cecilia Betzabet Bardales Vásquez & Jeisson David Cabos Sánchez

Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, La Libertad-PERÚ
cbardalesv@upao.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0002-7811-3676>
jcaboss1@upao.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0001-6331-2130>

Carlos Alberto León Torres & Estefany Lizbeth Jara Huacacolqui

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. La Libertad-PERÚ
cartaviolabs@hotmail.com // <https://orcid.org/0000-0002-9808-186X>
tefitas_love18@hotmail.com // <https://orcid.org/0000-0003-1216-1736>

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo enriquecer proteicamente los principales residuos lignocelulósicos de la Región La Libertad con la asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis* con la finalidad de producir un alimento con un valor nutritivo mayor que el que tradicionalmente ingiere el ganado. Se utilizaron 8 residuos lignocelulósicos de la región La Libertad: broza y coronta de *Zea mays* "maíz amarillo duro", brácteas y broza de *Cynara scolymus* var. *lorca* "alcachofa", peladilla y broza de *Asparagus officinalis* "espárrago" y hojas de *Saccharum officinalis* "caña de azúcar" recolectados de las empresas agroindustriales, los mismos que pasaron por un proceso de lavado, secado y fraccionamiento para poder ser utilizados como sustratos en el proceso fermentativo; el mismo que se realizó empleando un sistema de biorreactores de vidrio tipo tanque aireado, en los cuales se sometió a los residuos lignocelulósicos a la acción de la asociación mixta de los microorganismos durante un tiempo de 96 horas. Mediante método Kjeldahl se determinó el porcentaje de proteína de cada residuo antes y después del tratamiento. Los resultados indican que la broza de "maíz amarillo duro" es el residuo que genera mayor cantidad de ART correspondiente a 49.7 g/L en un tiempo de 96 horas de bioproceso. Asimismo, a partir de este residuo se obtuvo la mayor cantidad de proteína correspondiente a 28,59%, valor superior al porcentaje de proteína inicial del mismo residuo correspondiente a 9,39% antes de ser sometido a la acción de los microorganismos. Se concluye que la asociación mixta de microorganismos evaluados logra enriquecer proteicamente los residuos lignocelulósicos convirtiéndolos en una excelente opción para mejorar la alimentación animal.

Palabras clave: *Chaetomium cellulolyticum*, *Trichoderma reesei*, residuo lignocelulósico.

Abstract

This work aimed to protein enrich the main lignocellulosic residues of the La Libertad region with the joint association of *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* and *Candida utilis* in order to produce a food with a higher nutritional value than that traditionally ingested by livestock. 8 lignocellulosic residues from the La Libertad region were used: *Zea mays* sprout and crown "hard yellow corn", brácteas and broza of *Cynara scolymus* var. *lorca* "artichoke", peladilla and broza of *Asparagus officinalis* "asparagus" and leaves of *Saccharum officinalis* "sugar cane" collected from agro-industrial companies, the same that went through a process of washing, drying and fractionation to be used as substrates in the fermentation process; the same system that was performed using an aerated tank-type glass bioreactor system, in which lignocellulosic residues were subjected to the action of the mixed association of microorganisms for a time of 96 hours. Using the Kjeldahl method, the protein percentage of each residue was determined before and after treatment. The results indicate that hard yellow maize broza is the residue that generates the largest amount of ART corresponding to 49.7 g/L in a time of 96 hours of bioprocessing. In addition, from this residue the greatest amount of protein corresponding to 28.59% was obtained, higher than the percentage of initial protein of the same residue corresponding to 9.39% before being subjected to the action of the microorganisms. It is concluded that the mixed association of evaluated microorganisms manages to protein enrich lignocellulosic residues by making them an excellent option to improve animal feed.

Keywords: *Chaetomium cellulolyticum*, *Trichoderma reesei*, lignocellulosic residue.

Citación: Bardales, C; J. Cabos; C. León & E. Jara. 2020. Enriquecimiento proteico de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad con la asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis* para alimentación animal. *Arnaldoa* 27 (1): 99-114 <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27104>

Introducción

Los residuos lignocelulósicos agroindustriales, son definidos como aquellos residuos o subproductos de cultivos cosechados y que posteriormente han pasado por un proceso de modificación o procesamiento en industrias conserveras (Lázaro & Arauso, 2004).

Los materiales lignocelulósicos se componen de lignina, hemicelulosa, y celulosa. La celulosa está compuesta de largas cadenas de moléculas de glucosa, unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos, los cuales hacen que la cadena sea recta y de un número de polimerización mayor de 1000 y dependiendo del origen hasta 10,000 a 20,000 (Han, 2008). Esta estructura y la encapsulación de la lignina de las fibras de celulosa hace más difícil hidrolizar las moléculas de este material si se compara con el almidón (García, Quintero, & López, 2007). La hemicelulosa también se compone de largas cadenas, pero a diferencia de la celulosa contiene pentosas, la composición exacta de la hemicelulosa depende de la fuente del material celulósico.

Dentro de los organismos capaces de aprovechar estos materiales encontramos a los hongos que degradan la celulosa y lignina de troncos a través de enzimas que secretan al medio en el que crecen obteniendo así sus nutrientes (Garzón & Cuervo, 2008), en este grupo encontramos a *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* que usan como sustrato para su producción diversos residuos lignocelulósicos (Garcés *et al.*, 2006).

Las especies del género *Trichoderma* y *Chaetomium* agrupan especies lignocelulolíticas o ligninolíticas, cuyo sistema enzimático es capaz oxidar e hidrolizar enlaces de la lignina y la celulosa liberando las moléculas de glucosa y

dejándolas libres para ser utilizadas por los microorganismos capaces de fermentarla (Calvo, 2005).

Actualmente se considera que los residuos lignocelulósicos son compuestos orgánicos que pueden ser reinvertidos en el ciclo productivo de las empresas que los generan si se sigue un manejo sustentable de los mismos; mediante el compostaje generando biofertilizantes o de la forma más rápida utilizándolos como fuente de alimentos para los animales (Lázaro & Arauso, 2004).

Este patrón de utilización de los residuos contribuye con el mejoramiento ambiental, a través de la reducción de los índices de contaminación de algunos ecosistemas que se afectan por el arrojado de ciertos residuos orgánicos que modifican las condiciones físico - ambientales del entorno animal y vegetal, generando desequilibrio en su cadena trófica (Torres, 2000).

A inicios de la década de los 90, surgió en la región La Libertad, lo que se conoce como la "Revolución Verde", especialmente en los valles de Chao, Moche y Virú del departamento (=región) de La Libertad, en donde se marca un hito en la agricultura con una producción agrícola en crecimiento continuo, elevando exitosamente los rendimientos unitarios de los principales cultivos alimenticios y poniendo especial énfasis en los cultivos de agro exportación como el espárrago y el maíz, al cual luego le seguirían diversos cultivos como la alcachofa, pimiento piquillo entre otros. Los productos obtenidos después de la cosecha pasan a un posterior procesamiento en las fábricas conserveras generando durante el proceso los llamados residuos agroindustriales (Instituto Peruano del Espárrago, 2004).

Como parte del proceso de pelado

de espárrago en las plantas conserveras, se obtiene la peladilla lo que constituye aproximadamente el 25% en peso del espárrago adquirido. Una planta conservera de mediana infraestructura, procesa al día 60 TM de espárrago y desecha 15 TM de "peladilla"; este subproducto crudo es usado como alimento al ganado, sin embargo es necesario antes enriquecer el producto adicionándole proteínas.

Asimismo, el cultivo de alcachofa, maíz y pimiento piquillo generan grandes cantidades de residuos. Sin embargo, este tipo de forraje está limitado en cuanto a su composición nutritiva y aceptación por el ganado, por lo que se debe tener en cuenta que si la alimentación está sólo basada en este tipo de recurso, el animal perderá peso (Manterola, Cerda & Mira, 1999).

Debido a esto, diversas investigaciones han estado dirigidas al establecimiento de asociaciones mixtas de hongos filamentosos y levaduras para enriquecer sustratos lignocelulósicos con proteína microbiana para emplearlos en alimentación de rumiantes. (Ferrer & Aello, 2004). Estudios realizados por Porte et al. (2003), asociando *Trichoderma reesei* o *Chaetomium cellulolyticum* con *Candida lipolytica* demostraron un incremento en la producción de proteína microbiana utilizando como sustrato paja de trigo y empleando el cultivo mixto de *T. virid* y *Saccharomyces cerevisiae* o *C. utilis* sobre paja de centeno se aumentó la velocidad de hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa y la producción de proteína microbiana. Así también el estudio realizado por Barrena (1999) utilizando peladilla de espárrago como sustrato y un cultivo mixto de *Trichoderma reesei* y *Candida utilis* logró enriquecer en 10% el contenido proteico de la misma.

Teniendo en cuenta que La Libertad

es un departamento líder en la actividad agroindustrial destacando por su aporte de 11,6% al sector a nivel nacional y que debido a las políticas implantadas por el gobierno para impulsar la agroexportación y la culminación de la tercera etapa del proyecto de irrigación Chavimochic, esta actividad tenderá a crecer significativamente en las próximas décadas, la presente investigación tuvo como objetivo enriquecer proteicamente los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La libertad con la asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium litycum* y *Candida utilis*, con la finalidad de producir un alimento con un valor nutritivo mayor que el que tradicionalmente ingiere el ganado. Este proceso de reutilización de residuos lignocelulósicos a escala comercial se convierte en una alternativa económica y ecológicamente rentable tanto para las empresas del sector agroindustrial de nuestra región como para la población.

Materiales y métodos

Materiales: Material biológico.

"Brácteas" y broza de *Cynara scolymus* var. *lorca* "alcachofa" procedente de la Empresa Agroindustrial Damper SAC, ubicada en la Provincia de Virú, La Libertad-Perú.

"Peladilla" y broza de *Asparagus officinalis* "espárrago" procedente de la Empresa Agroindustrial Yosimar SAC, ubicada en la Provincia de Trujillo, La Libertad-Perú.

"Coronta" y broza de *Zea maiz* "maíz" procedente de la Empresa Agroindustrial Casa Grande, ubicada en la Provincia de Ascope Departamento de La Libertad-Perú.

"Hojas" de *Saccharum officinalis* caña de azúcar procedente de la Empresa Agroindustrial Casa Grande, ubicada en la

Provincia de Ascope Departamento de La Libertad- Perú.

“Broza” de *Capsicum annuum* “pimiento” procedente de la Empresa Agroindustrial Virú Sac.

ubicada en la Provincia de Virú Departamento de La Libertad- Perú.

Trichoderma reesei de la Colección Española de Cultivos Tipo- C.E.C.T 2414.

Chaetomium cellulolyticum de la Colección Española de Cultivos Tipo- C.E.C.T 2104.

Candida utilis var. *major* de la Colección Española de Cultivos Tipo- C.E.C.T 1430.

Métodos: Acondicionamiento de los residuos lignocelulósicos: Se colectó un aproximado de 2 kg de los principales residuos lignocelulósicos de la región La Libertad.; identificados según (Bardales, 2014). Se lavaron y posteriormente se secaron en estufa a temperatura constante 85°C/ 24 horas. Posteriormente fueron fraccionados a 1 mm de espesor (Bardales, 2009).

Pretratamiento de los sustratos: 500g de muestra se mezclaron con 2 ml/g de NaOH al 2% (p/v) y se autoclavaron a 121°C por 30 minutos a 1 ATM de presión. Seguidamente se lavaron con agua destilada y secaron en la estufa.

Acondicionamiento de los biorreactores: Se construyeron 21 biorreactores de vidrio tipo tanque aireado (León, 2006) de 1L de capacidad de 20 cm de altura por 10 cm de diámetro, con tapas y acondicionado con humidificador de aire, el cual empleó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad del tipo envase de mostaza, la cual llevó 50 ml de solución acuosa de NaCl al 10% (p/v). Se realizaron acoples con tubos de vidrio y mangueras de pvc de 0,64 com de diámetro (Barrena, 1999). La

esterilización de todo el sistema se llevó a cabo mediante cámara UV en tres sesiones de 30 minutos cada una. (Bardales, 2009).

Suministro de aire esteril: El aire estéril fue suministrado a partir de bombas de aireación de pecera air pump 300, pasando el aire por dos frascos de solución de NaCl al 20%, esterilizando así el aire que se suministró al sistema de fermentación a razón de 60 ml/ min a cada biorreactor (Bardales, 2009). Todo el sistema fue controlado automáticamente mediante el control airbiss ABB.

Reactivación de las cepas: Se usaron cepas liofilizadas de la colección española de cultivos tipo (CECT) de *Trichoderma reesei* 2414, *Chaetomium cellulolyticum* 2104 y *Candida utilis* 1430; las mismas que fueron reactivadas en agar sabouraud y agar sales minerales con celulosa respectivamente. Posteriormente, fueron conservadas en refrigeración, constituyendo los cultivos stock (Barrena, 1999).

Preparación del inóculo para el bioproceso: De los cultivos stock se sembraron 15 botellas planas de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de caldo sabouraud, 5 ml para cada microorganismo de estudio a 28°C por 10 días. Posteriormente se hicieron suspensiones de esporas, mohos y levaduras en 20 matraces de 200 ml cada uno con caldo sabouraud, con la finalidad de determinar el número de esporas/ml de la suspensión, para lo cual se utilizó la cámara de Neubauer (León, 2006).

Proceso fermentativo: Los biorreactores una vez ensamblados fueron alimentados con 100 gramos de residuos lignocelulósicos previamente tratados. Asimismo, fueron humedecidos con agua destilada estéril suplementada con sulfato de amonio a 1 gramo/litro del biorreactor y pH 4.5 (Bailón, 2001). Seguidamente se suministró 100 ml de

suspensión microbiana de *Trichoderma reesei* o *Chaetomium cellulolyticum* dejando actuar por 72 horas, previamente se tomó una muestra del material homogenizado para evaluar ART iniciales, nitrógeno amoniacal y biomasa microbiana. Posteriormente a las 72 horas se aplicó el inóculo de *Candida utilis* y se dejó actuar por 6 días. Asimismo, se realizaron conteos diarios del desarrollo de biomasa de *Candida utilis* para monitorear su desarrollo. Al final del mismo proceso se evaluaron los mismos parámetros (ART, nitrógeno amoniacal y biomasa de *Candida utilis*).

Determinación de nitrógeno:

Transcurrido el tiempo de fermentación se retiró todo el contenido de los biorreactores y se secó a estufa a 85 °C por 24 horas. Posteriormente fue molido finamente en malla 80. El nitrógeno total fue determinado por el método Kjeldahl, seguido de un método espectrofotométrico.

Determinación de azúcares reductores totales-ART.: Se siguió el método propuesto por Bardales (2009).

Cuantificación de biomasa de *Candida utilis*: Se realizó mediante el método propuesto por (Bardales, 2009; León, 2009).

Diseño experimental: Se siguió el diseño en bloques de una sola casilla, con pre test y post test para cada una de los 5 principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la región La Libertad. Asimismo, se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento.

Análisis estadístico: La determinación de diferencias entre tratamientos se realizó con la prueba t de student. La variación entre tratamientos se determinó mediante test de ANVA7, Tukey.

Resultados y discusión

La Tabla 1, muestra los resultados promedio de los azúcares reductores totales (ART) obtenidos de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*, a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad. 2018. Durante 4 días de bioproceso. La broza de “maíz amarillo duro” es el residuo lignocelulósico del cual se obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores totales con un promedio de 49.3 g/L y la peladilla de espárrago el residuo del que menor cantidad de ART se puede obtener con un promedio de 5,2 g/L respectivamente. Esta tabla también indica que la cantidad de ART obtenidos a partir de los diferentes residuos lignocelulósicos evaluados aumenta a medida que se establece la asociación mixta entre *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*, debido a la acción que ejerce *Trichoderma* sobre la lignina y *Chaetomium* sobre la celulosa.

La tabla 2 muestra los valores de F y p del Análisis de Varianza trifactorial y unifactorial para estimar la influencia de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* en la producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la región La Libertad, 2018.

En la Tabla 2 el análisis de varianza trifactorial realizado, muestra que existen diferencias significativas en la producción de ART en función del tipo de residuos, microorganismos y tiempo. Sin embargo, no existe acción aditiva (interacción) entre ellos con respecto a la producción de ART. Del mismo modo el análisis de varianza unidireccional ratifica las diferencias detectadas en el anava tridimensional. La agrupación de las diferencias entre niveles de cada factor.

La tabla 3 muestra los resultados de la Prueba de Tukey para tipificar diferencias dentro de cada factor en la producción de Azúcares Reductores Totales (ART). Los factores evaluados fueron: el tipo de residuo, el microorganismo y el tiempo del bioproceso con la finalidad de establecer diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la prueba muestran clara diferencia significativa entre usar broza de “maíz amarillo duro” y los otros residuos evaluados como sustrato para el bioproceso. Así también para el factor microorganismo, la asociación mixta *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* mostraron evidentes diferencias significativas; mientras que para el factor tiempo evaluado en el bioproceso, 96 horas es estadísticamente diferente a 40, 60 y 20 minutos y sería el tiempo adecuado para llevar a cabo un bioproceso con la asociación mixta *Chaetomium cellulolyticum* y *Trichoderma reesei*.

Por otro lado la tabla 4 muestra los resultados promedio del porcentaje de proteína Total determinado por el método Kjeldhal de la producción de biomasa de *Candida utilis* var. *major* 1430 obtenida de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de La Región La Libertad. 2018, durante 24 horas de bioproceso. Se puede observar que el mayor porcentaje de proteína se obtuvo a partir del residuo lignocelulósico broza de maíz amarillo duro con un promedio de 28,59% los resultados además se corroboran según los estadísticos de las tablas 5 y 6 respectivamente.

La biomasa lignocelulósica es una materia prima abundante y renovable, con una estimación de una producción mundial anual de entre 10 y 50 mil millones de toneladas de materia secas, aunque sólo una pequeña parte puede ser utilizada en

la práctica, incluyendo la paja de cereales, paja de trigo, cáscara de arroz, mazorcas de maíz, rastrojo de “maíz”, brácteas de “alcachofa”, “peladilla de espárrago”, bagazo de “caña de azúcar”, cáscaras de frutos secos, residuos de cosecha forestal y residuos de proceso de madera (Casanova, 2018). El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para la generación de productos de valor agregado a partir de sus fracciones constituyentes como la hemicelulosa y la celulosa, requiere en primera instancia la eliminación de las barreras que dificultan el acceso de catalizadores químicos o biológicos que contribuyen a su transformación, con el fin de obtener una mayor velocidad de reacción y mejores rendimientos (Casanova, 2019).

La factibilidad económica de la producción de proteína unicelular depende básicamente del uso eficiente de un sustrato barato por el microorganismo, el cual debe proceder de actividades industriales propias de la zona en donde se desea producir la proteína unicelular (Nigan, 2000), esto logra que el sustrato empleado sea de bajo costo, disponible durante todo el año y sobre todo el proceso contribuye a limpiar el medio ambiente de los desechos industriales; lo cual hace de esta actividad una alternativa económica, social y ecológica (Carter, 1996).

Tabla 1: Resultados promedio de los Azúcares Reductores Totales (ART) obtenidos de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*, a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad. 2018. Durante 4 días de bioproceso.

RESIDUO	DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN	AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART) g/L.					
		TIEMPO (HORAS)					
		0	20	40	60	80	96
BROZA DE MAIZ AMARILLO DURO	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	09.53	15.2	28.8	37.0	44.3
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	07.0	13.7	25.3	31.0	36.4
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	13.5	21.8	31.1	42.1	49.7
HOJAS DE CAÑA DE AZÚCAR	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	7.1	10.7	16.6	19.0	21.3
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	06.3	10.9	12.6	15.0	17.0
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	09.2	14.2	18.1	19.4	23.4
CORONTA DE MAIZ AMARILLO DURO	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	05.9	09.8	15.7	17.7	18.3
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	03.5	08.8	10.5	12.2	12.8
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	04.2	15.2	22.9	25.4	26.9
BROZA DE PIMIENTO	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	05.5	09.0	11.50	11.8	12.4
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	04.3	07.8	08.4	09.3	09.6
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	06.9	08.4	13.7	14.7	15.5

Van...

Vienen...

RESIDUO	DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN	AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART) g/L.					
		TIEMPO (HORAS)					
		0	20	40	60	80	96
BROZA DE ALCACHOFA	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	02.5	05.5	08.6	09.3	09.4
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	01.9	03.9	06.3	07.0	07.5
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	03.5	05.6	09.3	10.4	11.7
BRACTEAS DE ALCACHOFA	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	01.2	03.3	07.2	08.8	09.5
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	09.0	02.9	04.2	06.9	07.1
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	03.6	05.7	08.9	10.9	11.2
BROZA DE ESPARRAGO	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	01.7	03.4	05.5	06.4	06.7
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	01.0	02.5	04.4	05.0	05.4
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	02.2	04.3	05.7	06.8	07.7
PELADILLA DE ESPARRAGO	<i>Trichoderma reesei</i>						
		PROM	00.5	02.8	03.6	03.9	04.1
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	00.4	00.9	01.8	02.3	02.6
	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>						
		PROM	01.2	02.9	04.1	04.8	05.1

Tabla 2: Valores de F y p del Análisis de Varianza trifactorial y unifactorial para estimar la influencia de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* en la producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la región La Libertad, 2018.

FUENTES DE VARIACIÓN	ANAVA TRIFACTORIAL		ANAVA UNIFACTORIAL	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Modelo	8.09	0.000		
Lineal	17.66	0.000		
Residuos	7.92	0.006	70.42	0.000
Microorganismos	5.07	0.026	7.14	0.001
Tiempo	39.98	0.000	9.77	0.000
Interacciones de 2 términos	1.02	0.388		
Residuos* Microorganismos	0.25	0.617		
Residuos*Tiempo	1.96	0.164		
Microorganismos *Tiempo	0.83	0.363		
Interacción de 3 términos	0.02	0.885		
Residuos *Microorganismos *Tiempo	0.02	0.885		
Error				
Falta de ajuste	10848.98	0.000		
Error puro				
Total				

Diferencias significativas con $p = 0.05$

Tabla 3: Prueba de Tukey para tipificar diferencias dentro de cada factor en la producción de Azúcares Reductores Totales (ART).

	Factores	Agrupación
Residuos	Broza de maíz Amarillo	A
	Hojas de Caña de azúcar	B
	Coronta de maíz amarillo	B
	Broza de pimiento	C
	Broza de Alcachofa	D
	Brácteas de alcachofa	D
	Broza de espárrago	E
	Peladilla de espárrago	F
Microorganismos	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>	A
	<i>Trichoderma reesei</i>	A B
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	B
Tiempo (horas)	Noventa y seis (96)	A
	Ochenta (80)	A
	Sesenta (60)	A B
	Cuarenta (40)	B C
	Veinte (20)	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Tabla 4: Resultados promedio del porcentaje de proteína Total por el método de Kjeldhal de la producción de biomasa de *Candida utilis* var. *major* 1430 obtenida de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de La Región La Libertad. 2018. Durante 24 horas de bioproceso.

RESIDUOS	PROTEINA TOTAL (%)			
	DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN			
	RESIDUO SOLO	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Candida utilis</i>	<i>Chaetomium cellulolyticum</i> + <i>Candida utilis</i>	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Ch. cellulolyticum</i> + <i>Candida utilis</i>
BROZA DE MAIZ AMARILLO DURO				
PROMEDIO	09.39	25.22	22.66	28.59
HOJAS DE CAÑA DE AZÚCAR				
PROMEDIO	02.91	19.61	17.49	23.35
CORONTA DE MAIZ AMARILLO DURO				
PROMEDIO	05.72	17.48	16.07	21.16
BROZA DE PIMIENTO				
PROMEDIO	02.27	16.51	13.86	18.76
BROZA DE ALCACHOFA				
PROMEDIO	03.67	14.92	12.61	17.30
BRACTEAS DE ALCACHOFA				
PROMEDIO	04.15	13.58	12.27	16.21
BROZA DE ESPARRAGO				
PROMEDIO	04.54	12.44	10.66	15.42
PELADILLA DE ESPARRAGO				
PROMEDIO	03.44	11.77	09.55	13.66
TESTIGO (T) <i>Candida utilis</i> Var. Major C.E.C.T 1430	PROTEINA TOTAL (%)			
	43.87			
	43.90			
	42.15			
PROMEDIO	43.31			

Tabla 5: Valores de F y p del Análisis de Varianza trifactorial y unifactorial para estimar la influencia de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* en la producción de Proteína total de *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430 a partir de los Azúcares Reductores Totales obtenidos de los principales residuos Lignocelulósicos Agroindustriales de la región La Libertad, 2018. Durante 24 horas de bioproceso.

FUENTES DE VARIACIÓN	ANAVA TRIFACTORIAL		ANAVA UNIFACTORIAL	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Modelo	9.09	0.000		
Lineal	25.66	0.000		
Residuos	6.92	0.003	40.11	0.001
Microorganismos	4.07	0.006	5.12	0.001
Tiempo	24.98	0.000	7.28	0.001
Interacciones de 2 términos	1.02	0.298		
Residuos* Microorganismos	0.35	0.485		
Residuos*Tiempo	1.96	0.164		
Microorganismos *Tiempo	0.83	0.363		
Interacción de 3 términos	0.02	0.589		
Residuos*Microorganismos *Tiempo	0.02	0.965		
Error				
Falta de ajuste	10848.98	0.000		

Diferencias significativas con $p = 0.05$

Tabla 6: Prueba de Tukey para tipificar diferencias dentro de cada factor en la evaluación de la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum* en la producción de Proteína total de *Candida utilis* Var. Major C.E.C.T. 1430 a partir de los Azúcares Reductores Totales obtenidos de los principales residuos Lignocelulósicos Agroindustriales de la región La Libertad, 2018. Durante 24 horas de bioproceso.

	Factores	Agrupación
Residuos	Caldo Sabouraud (Testigo)	A
	Broza de maíz Amarillo	B
	Hojas de Caña de azúcar	B C
	Coronta de maíz amarillo	C
	Broza de pimiento	C D
	Broza de Alcachofa	D
	Brácteas de alcachofa	D
	Broza de espárrago	D
	Peladilla de espárrago	D
Microorganismos	<i>Trichoderma reesei</i> + <i>Chaetomium cellulolyticum</i>	A
	<i>Trichoderma reesei</i>	A B
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	A B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Conclusiones

La producción de biomasa de *Candida utilis* var. *major* a partir de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la región La Libertad se ve influenciada por la asociación mixta de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*.

El mayor porcentaje de enriquecimiento proteico corresponde a 28.59 g determinado por el método Kjeldahl y se obtuvo a partir del residuo broza de maíz amarillo duro con la asociación de mixta *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis*.

La asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis*

logra mejorar el contenido proteico de los residuos lignocelulósicos.

Agradecimientos

A la Universidad Privada Antenor Orrego, por el financiamiento otorgado mediante el Fondo de Apoyo a la Investigación FAIN 2017 con resolución rectoral N° 5107-2017-R-UPAO. Gracias por promocionar, apoyar e incentivar la investigación docente.

Contribución de los autores

C.B. análisis de los datos, aprobación del informe final y exposición de los informes de avance de proyecto. J.C. Recolección y

procesamiento de muestras lignocelulósicas C.L. Tratamiento de las muestras, determinación de azúcares reductores totales y biomasa. E.J. Recolección, tratamiento de muestras y *análisis estadístico* de los datos de la investigación.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Literatura citada

- Bailón, S.** 2001. Influencia del sulfato de amonio, nitrato de potasio y urea en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Microbiología Industrial y Biotecnología, Universidad Nacional de Trujillo.
- Bardales, C.; J. Mostacero.; C. León; J. Arellano.; M. Salazar.; C. Nomberto & O. Pretell.** 2009. Extracción de azúcares reductores totales "ART" de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago" por métodos físicos, químicos y físico químicos. Revista ARNALDOA. Vol 16(1). Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo. Perú.
- Bardales, C.** 2014. Valor económico de los residuos lignocelulósicos de los principales cultivos agrícolas del Valle Virú. La Libertad- Perú, 2014. Revista Arnaldoa. Universidad Privada Antenor Orrego. Volumen 22(1): enero- junio 2015.
- Barrena, M.** 1999. Optimización del enriquecimiento proteico de "peladilla de espárrago" (*Asparagus officinalis* L.) con cultivo mixto de *Trichoderma reesei* con *Candida utilis* y *Chaetomium cellulolyticum* con *Candida utilis*. Tesis para optar el grado de maestro en ciencias con mención en Microbiología industrial y biotecnología. Trujillo. Perú.
- Calvo, B.** 2005. Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez, J., Roise, D. (Eds). Editorial LIMUSA, México.
- Carter, G.** 1996. Comercial Biotechnology: An international Analysis. Webered. New York. Estados Unidos.
- Casanova, M.** (2019). Optimización de la concentración azúcares reductores totales de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar" en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Trujillo – Peru. 2018. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Biotecnología Agroindustrial y Ambiental. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Ferrer, A. & C. Aello.** 2004. Utilización de residuos de cosecha y sub productos agrícolas en la producción de alimentos para animales rumiantes. Revista de Agronomía Luz. Vol 11,
- Garcés, A.; N. Vélez.; S. Ruiz.; J. Serna & E. Suarez.** 2006. Evaluación de algunos residuos orgánicos como sustrato para el cultivo de hongos comestibles. Revista Lasallista de Investigación, 2(2), 15-20.
- García, M.; R. Quintero & A. López.** 2007. Biotecnología alimentaria. México D. F.: Limusa.
- Garzón, J. & J. Cuervo.** 2008. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. Nova- Ciencias Biomédicas.
- Han, J.** 2008. "Properties of non Wood Fibers", USDA Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison WI 53705-2398.USA.
- Instituto Peruano del Espárrago.** 2004. Primer censo nacional de productores y plantas de procesamiento de espárrago. Lima. Perú.
- Lázaro, L. & J. Arauzo.** 2004. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Universidad de Zaragoza. España.
- León, C.** 2009. Influencia de la concentración de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar" en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Manterola, H. & D. Cerda.** 1999. Proyecto valoración nutritiva, conservación y aprovechamiento de residuos derivados de la producción e industria hortícola en la alimentación animal. 29 p. (Informe N°1 presentado a FIA).
- Nigan, J.** 2000. Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic Hydrolyzate for the production of single all protein. Weekly Journal of Microbiology and Biotechnology, p. 367-372.
- Porte, E.; H. Manterola.; D. Cerda.; L. Sirhan.; J. Mira & M. Barbieri.** 1993. Estudios del uso de residuos agroindustriales en alimentación animal. I. Comportamiento productivo de novillos Hereford ali-

mentados con dietas incluyendo niveles crecientes de pomasa de tomate. Avance Prod. Anim. 18(1-2): 55-62.

Torres, C. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azobacteria* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-Acetic Acid Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol 42. Pp 171-176p